

局所脳虚血に対するムスカリン作動性アセチルコリン受容体 および mRNA の経時的变化についての核医学的研究

金沢大学医学部核医学講座 (主任: 久田欣一教授)

久 慈 一 英

脳内各種受容体の各種侵襲に対する反応を知ることは、生理的自動制御機構や病態を理解する上で重要であり、臨床すでに実用段階に入った核医学的手法による受容体画像の解釈には不可欠となる。コリン作動性神経はアルツハイマー病患者で減少することが知られ、コリン作動性神経と関連するムスカリン作動性アセチルコリン受容体 (muscarinic acetylcholine receptor, mAChR) は痴呆病態の一面を形成していると考えられる。mAChR の虚血に対しての局所的な反応は報告されているが、脳梗塞後の脳全体の mAChR 分布の変化と血流分布の関係については報告はほとんどない。虚血に対する mAChR の反応を調べるために、ラット中大脳動脈閉塞モデルおよび対照シャム手術モデルを作成し、脳梗塞急性期および慢性期において同一個体にて3種類の脳連続切片画像化を行なった。まず、 ^{99m}Tc -ヘキサメチルプロピレンアミノキシム (^{99m}Tc -hexamethylpropyleneamine oxime, ^{99m}Tc -HMPAO) による生体内 (ex vivo) 脳血流画像化、 ^3H キナクリジニルベンジレート (^3H quinuclidinyl benzilate, ^3H -QNB) による生体外 (in vivo) 受容体画像化を行なった。さらに mAChR で知られている m1 から m5 のサブタイプ遺伝子の mRNA について特異的な ^{35}S 標識オリゴヌクレチドを用いた組織内ハイブリダイゼーション (in situ hybridization) 法を用いて、mAChR-mRNA の分布画像を作成した。各画像データはデジタルデータ化し半定量的に評価した。血流、mAChR、mAChR-mRNA では経時的变化に解離が認められた。急性期では梗塞部位を中心に血流は著しく減少したが mAChR は有意な変化はなかった。慢性期では患側視床の血流がほとんど変化しないにもかかわらず mAChR は減少し、黒質では血流がわずかに増加するにもかかわらず mAChR は減少した。mAChR-mRNA は、尾状核線条体にて急性期から減少が認められ、梗塞部位のコリン作動性神経細胞の受容体合成が早期から低下していることが示唆された。mAChR は急性期では保たれていたことから、生きているが機能を停止した神経細胞の存在を示唆すると考えられた。特に mAChR 分布は血流情報とは異なる神経機能情報を鋭敏に示し、局所虚血時における神経細胞の生存や遠隔効果を知る指標として有用であることが示された。以上のように、血流、受容体、受容体 mRNA の各分布を半定量的に解析し比較することで、血管性痴呆やアルツハイマー病患者などにおける受容体イメージングを理解する際に重要な血流とムスカリン作動性アセチルコリン受容体分布の関係について新しい知見が得られた。

Key words muscarinic acetylcholine receptor, middle cerebral artery occlusion, in situ hybridization, muscarinic receptor mRNA, cerebral blood flow

脳においてムスカリン作動性アセチルコリン受容体 (muscarinic acetylcholine receptor, mAChR) は、運動機能、体温調節、傷害受容、摂食行動、攻撃行動、睡眠、記憶、学習に関与していることが知られている¹⁾。近年の分子生物学の進歩により mAChR に対する cDNA のクローニングがなされ、分子多様性が示され m1 から m5 までの5種類のサブクラスが知られている^{2)~4)}。mAChR の多様性はリガンド結合能、二次情報伝達系、遺伝子解析の立場からは解明されつつあるものの構造と機能の関係についての最終的な結論は出ていない。アルツハイマー病の患者脳では Mynert 核でのコリン作動性神経の変性⁵⁾と mAChR の減少が著明であるが、大脳皮質では mAChR の変化については種々の報告があり結論は出ていない⁶⁾。培養細胞にて mAChR の刺激によってアルツハイマー病の特徴であるア

ミロイド前駆体物質が放出されることも報告されている⁷⁾。各種ストレスに対する mAChR の分布変化を知ることは、近年になって臨床重要になってきた核医学的手法による生体内受容体分布画像を読影する際に不可欠である。

今回、mAChR の脳虚血に対する急性期と慢性期の経時的变化を中大脳動脈閉塞脳梗塞モデルラットにおいて ^{99m}Tc -ヘキサメチルプロピレンアミノキシム (^{99m}Tc -hexamethylpropyleneamine oxime, ^{99m}Tc -HMPAO) と ^3H キナクリジニルベンジレート (^3H quinuclidinyl benzilate, ^3H -QNB) のオートラジオグラフィおよび ^{35}S 標識オリゴヌクレチドプローブを用いた組織内ハイブリダイゼーション (in situ hybridization)⁸⁾によって局所分布を調べ、高感度ビデオカメラとパーソナルコンピュータを用いた画像解析的デンストメトリーにより半定量的に解析

平成5年12月15日受付, 平成6年1月21日受理

Abbreviations: EDTA, ethylene-diamine-tetraacetic acid; GABA, γ -aminobutylic acid; HMPAO, hexamethyl-propyleneamine oxime; mAChR, muscarinic acetylcholine receptor; PBS, phosphate-buffered saline; QNB, quinuclidinyl benzilate; rCBF, regional cerebral blood flow; SSC, standard saline citrate

した。

対象および方法

対象は、Sprague-Dawley 系雄ラット約 8 週齢、250–350g (三協ラボサービス、東京) を用いた。中大脳動脈閉塞ラットを作成し、術後 2–3 時間後に屠殺した急性期モデル 7 例と術後 2 週間後に屠殺した慢性期モデル 9 例と偽手術のみ施して屠殺した対照シャム手術モデル 6 例を用いた。

1. 梗塞モデル

中大脳動脈モデルラットは Tamura らの方法⁹⁾ に準じて作成した。酸素、笑気、ハロセンを流量比 1:2:1 の割合で混合したガス麻酔下にてラットの側頭部を消毒し皮膚切開した後、側頭筋を剥離しながら頬骨弓をかじり取り、下顎骨を筋突起から一部かじり取って側頭下顎関節を脱臼させる。下顎神経を追及して卵円孔を確認した後、その約 3mm 前方 1mm 側方の頭蓋骨に電気ドリルで開窓し中大脳動脈を確認してから硬膜を注射針で切り、中大脳動脈を露出する。中大脳動脈をパイポラーにて熱凝固し閉塞した。閉塞を確認した後に閉創し消毒した。麻酔がさめた後に、手術反対側の運動麻痺にて神経症状を確認した。

II. 定量化

1. 脳血流分布の画像化

すでに報告された手法^{10,11)} に従い、ラットを台に固定して尾静脈から、HMPAO のセレテック (アマシャム、東京) に ^{99m}TcO₄⁻ (約 370MBq/ml, 第一ラジオアイソトープ、東京) を混合して標識した ^{99m}Tc-HMPAO を 370MBq 静注した後断頭屠殺し、ただちに脳を取り出しティッシュテック (三共、東京) で包埋しヘキサソードドライアイスにて急速凍結した。これを、クリオスタット内で厚さ 15μm にマイクロームで薄切しゼラチンスライドガラスに貼り付けた。風乾した後、エックス線フィルム ニュー C (コニカ、東京) にて 0℃ で 15 時間露光しオートラジオグラフィーを得た。

2. mAChR 分布の画像化

^{99m}Tc-HMPAO が無視できるほど減衰した約 7 日後に、^{99m}Tc-HMPAO にて用いた切片をスライドホルダーに並べ、染色瓶にて ³H-QNB 結合反応を行なった。10mM エチレンジアミン四酢酸 (ethylene-diamine-tetraacetic acid, EDTA) (和光、大阪)、50mM リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH 7.4) 中にて室温で 30 分置き、50mM PBS 溶液に 1mM EDTA、1mM N-エチルマレイミド (Sigma, St. Louis, U.S.A.), 1nM ³H-QNB (1346.8GBq/mmol, アマシャム) と加えた溶液中で 3 時間反応させた後で、氷冷 50mM PBS 溶液で 10 分間洗浄を 2 回行なった。これを、風乾して専用フィルム (Hyperfilm-³H, アマシャム) にて 0℃ で 2 週間露光してオートラジオグラフィーを行なった。

3. mAChR-mRNA 分布の画像化

1) ³⁵S による標識

今回用いたオリゴヌクレオチドは全て市販品を用いた。ラットムスカリンレセプター m1 プロンプ NEN-545 (Dupont, Boston, U.S.A.), 同 m2 NEN-546 (Dupont), 同 m3 NEN-547 (Dupont), 同 m4 NEN-548 (Dupont), 同 m5 NEN-595 (Dupont) である。配列は、m1 が TGG-TGC-CAA-GAC-AGT-GAT-GTT-GGG-ACT-GAC-AGC-AGG-GGG-CAC-TGA-GGT で m1 mRNA の 4–51 番の配列に相補的な配列で

あり、以下同様に m2 が AGG-ACT-GGT-AAT-AGC-CAA-CCC-ATT-GTT-CTG-GGA-CTT-TGT-TGA-GTT-ATT で m2 mRNA 配列の 4–51 番、m3 が GCT-GAT-GTT-GGG-AAA-CAA-AGG-CTG-TGT-ACT-GTT-ACT-GTG-CAA-GGT で m3 mRNA 配列の 4–51 番、m4 が GCG-CAC-AGA-CTG-ATT-GGC-TGA-GCT-GCC-ATT-GAC-AGG-CGT-GAA-GTT で m4 mRNA 配列の 4–48 番、m5 が ATT-TAC-CGG-GGT-GCC-GTT-GAC-AGT-GCT-TTC-ATT-GTA-AGA-CTC-CCC-TTC で m5 mRNA 配列の 1–48 番に相補的な配列の合成オリゴヌクレオチドである。これらの、プローブをチューブ (アシスト、東京) に分注した後凍結乾燥させ、3'-オリゴヌクレオチドエンドラベリングシステム (Dupont) を用いて、[³⁵S]-デオキシアデノシン 5'-[α-チオ] トリリン酸 ([³⁵S]-Deoxyadenosine 5'-[α-thio] triphosphate, ³⁵S-dATP) (51.1 TBq/mmol, Dupont) にて 3'末端を ³⁵S 標識し精製したものを以下の組織内ハイブリダイゼーションに使用した。

2) 組織内ハイブリダイゼーション

^{99m}Tc-HMPAO が無視できるほど減衰した約 7 日後に、切片を 4%ホルマリン 0.1M PBS (pH 7.4)、4℃ で 30 分後固定させた後、0.1M PBS、4℃ で 5 分間洗浄した。これを、200ml 中、NaCl (和光) 1.8g、トリエタノールアミン (ナカライテスク、京都) 3ml、無水酢酸 (ナカライテスク) 0.5ml を混合した無水酢酸/トリエタノールアミン溶液にて室温で 10 分間プレインキュベーションした後、脱水、脱脂して乾燥させた。ハイブリダイゼーションバッファ (ダイアマトロン、東京) 250μl、ジチオスレイトール (Dithiothreitol) (ダイアマトロン) 5μl、前述の ³⁵S 標識オリゴヌクレオチドプローブ約 2×10⁴ Bq を混合したハイブリダイゼーション液を調整し、スライドガラス上に約 300μl 滴下し切片全体に広がるようにパラフィルム (井内盛栄堂、大阪) をかぶせた。これを、湿箱中で 42℃ で 12 時間インキュベーションを行った。1×標準クエン酸生理食塩水 (standard saline citrate, SSC) (pH 7.4) 中でゆっくりとパラフィルムをはずし、1×SSC で室温 10 分置き、1×SSC 55℃ で 15 分で 4 回洗浄し、1×SSC で室温 10 分に置いた後に脱水し乾燥させた。このスライドガラスをエックス線フィルム ニュー C (コニカ) にて -70℃ で 2 か月間露光しオートラジオグラフィーを得た。

4. 画像の定量化

1) フィルム画像のデジタル画像化

フィルムの画像は、CCD カメラ XC-77 (ソニー、東京) を介し、PC-9801RS (NEC、東京) にイメージメモリーボード IMB-512SL8 (三谷商事、福井) を搭載したビデオデジタイザーシステムにより 320×240×8 ビット (256階調) のデジタル画像データに変換された。この画像データをマッキントッシュ IIci (アップルコンピュータジャパン、東京) に転送し画像処理専用ソフトウェアである NIH Image ver 1.46 (National Institute of Health, Bethesda, U.S.A.) にて画像処理を行なった。

2) 放射能とフィルム黒化度との関係

放射能とフィルム上の黒化度の関係については、^{99m}Tc-HMPAO については関係が直線性が保たれる範囲内とした。³H-QNB、³⁵S については放射能濃度が既知のゼラチンコントロール切片を作成しフィルム黒化度との関係を調べた。

5. 健側に対する患側の比による比較

1 匹のラットにつき対応する連続切片の 3 種類それぞれ約 5–7 枚ずつのデータの画像について、任意形状の関心領域を

両側の大脳皮質(前頭葉, 頭頂葉, 側頭葉, 後頭葉), 側座核, 尾状核線条体, 海馬, 視床, 扁桃核, 上丘, 黒質, 三叉神経運動核, 小脳, 中脳橋核に設定して黒化度を求めた. なお, ラット脳の解剖は Paxinos らのアトラス¹²⁾を参照した. バックグラウンドを差し引いた後で, 健側に対する患側の黒化度の比を各部位ごとに算出した.

Ⅲ. 統計解析

各部位の患側対健側比は, シャム手術群, 急性期群, 慢性期群の各群ごとに平均, 標準偏差を算出した. まず分散分析法にて各群間の有意差の検定を行ない, 有意差のある群間にて F 検定を行なって, 等分散のときは Student の独立二標本間 t 検定, 異分散のときは Welch の t 検定を用いてシャム手術群に対し

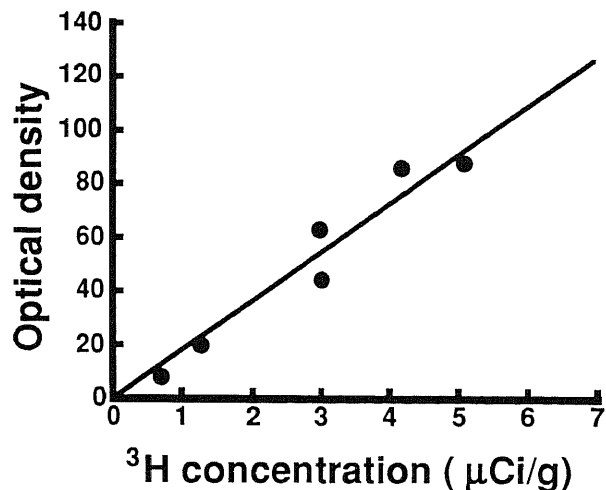


Fig. 1. The standard curve for ^3H . The mean optical densities ($n=10$) are plotted against tracer activities. Linearity is observed between optical density and ^3H activity.

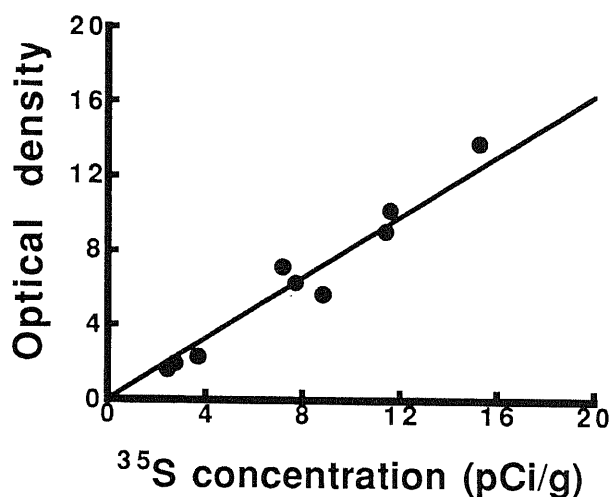


Fig. 2. The standard curve for ^{35}S . The mean optical densities ($n=5$) are plotted against tracer activities. Linearity is observed between optical density and ^{35}S activity.

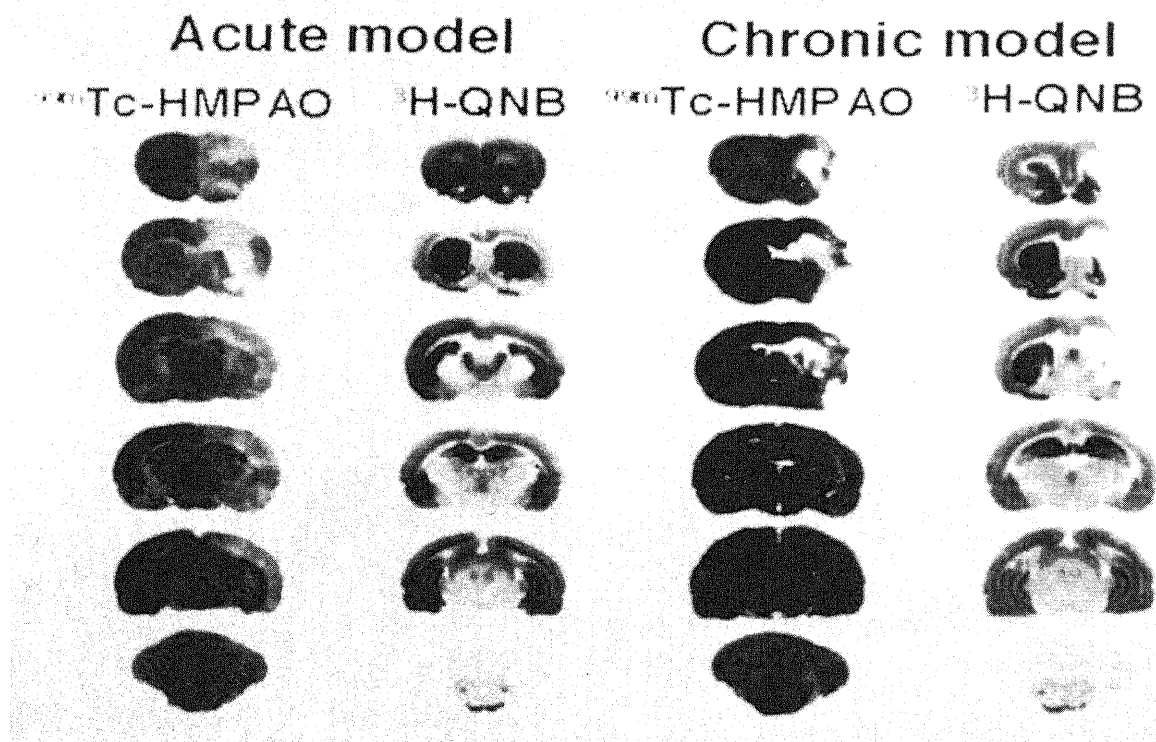


Fig. 3. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -hexamethyl-propyleneamine oxime ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO) and [^3H]quinuclidinyl benzilate (^3H -QNB) images of sequential coronal brain sections of an acute infarct model and a chronic infarct model. The right side of the figure is affected-side. The regional cerebral blood flow (rCBF) shown by $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO distribution in the affected-side of both models decreased apparently. The mAChR shown by ^3H -QNB distribution in the affected-side of the acute model didn't decrease, but apparently decreased in the affected-side of the chronic model.

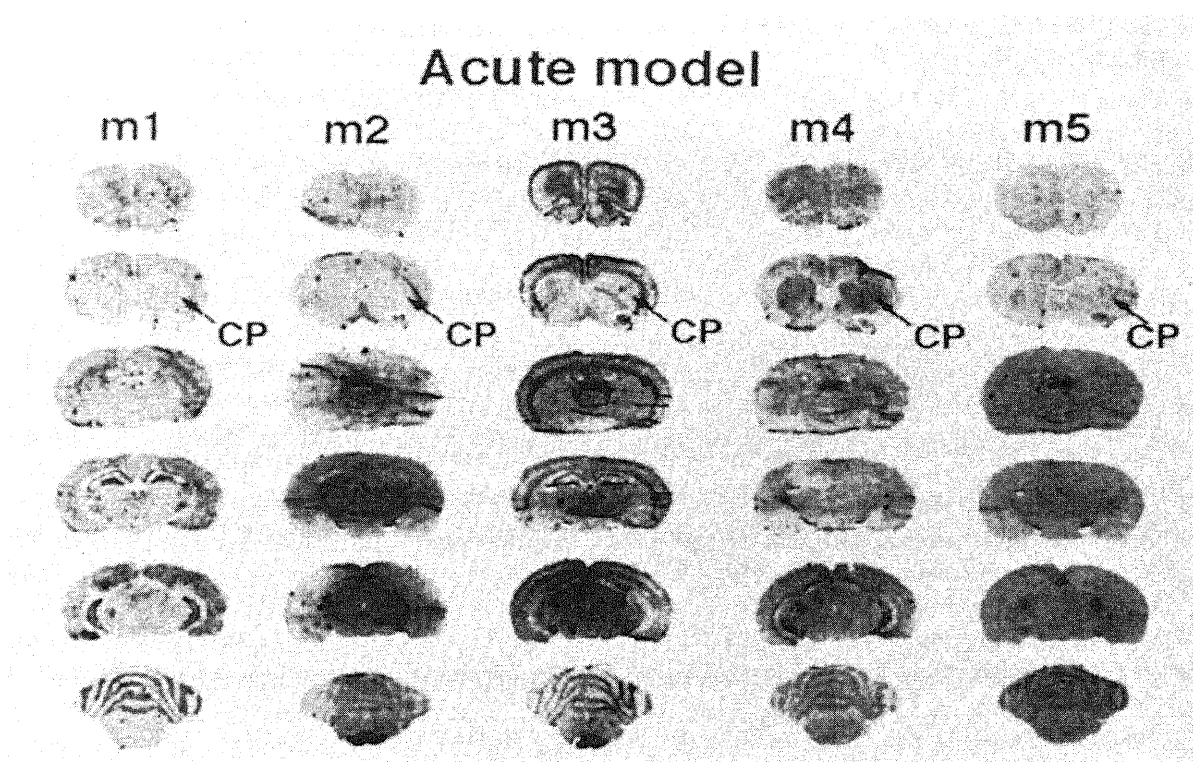


Fig. 4. Five mAChR-mRNA (m1~m5) images of sequential coronal brain sections of an acute model using in situ hybridization method. The m2-mAChR-mRNA of the caudate-putamen (CP) slightly decreased. Changes of other mAChR-mRNAs of caudate-putamen are not obvious from this figure.

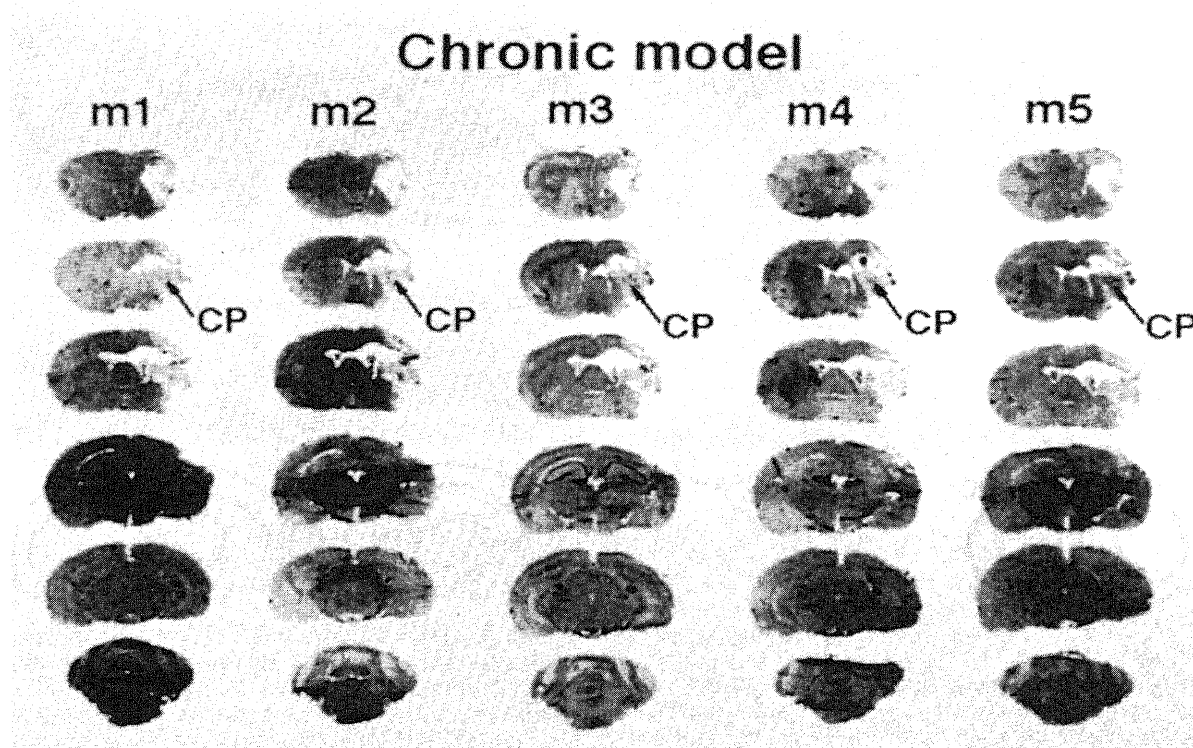


Fig. 5. Five mAChR-mRNA (m1~m5) images of sequential coronal brain sections of a chronic model using in situ hybridization method.

て有意な変化があったかどうかを検定した。危険率5%未満をもって有意とした。

成 績

I. 放射能とフィルム黒化度の関係

^3H と ^{35}S の放射能とフィルム黒化度との関係を図1と図2に示す。今回用いた画像データの ^3H -QNB の濃度は、図1のグラフから、用いた放射能濃度ではフィルム上の黒化度との関係に直線性が認められることが確認された。また、 ^{35}S についても図2より、用いた放射能濃度以下での放射能とフィルム黒化度との関係は直線性があることが確認された。以上より放射能濃度の比は黒化度の比に置き換えて良いことが証明された。

II. オートラジオグラフィ

急性期モデルと慢性期モデルの $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO と ^3H -QNB の画像の各1例を図3に示す。ml~m5 の ^{35}S 標識オリゴヌクレオチドプローブによる組織内ハイブリダイゼーションの画像を急性期モデルの1例は図4に、慢性期モデルの1例は図5に示す。3種画像は急性期、慢性期ともそれぞれ同一個体の対応する冠状断である。急性期モデルでは中大脳動脈支配領域の尾状核線条体と頭頂葉大脳皮質中心に血流の低下が著しいが、mAChR はほとんど変化がなかった(図3)。mAChR-mRNA はやや尾核に減少があるが大きな変化はなかった(図4)。慢性期では梗塞部の壊死と萎縮が明らかで、血流、mAChR、mAChR-mRNA とも大きく減少した(図3, 5)。変化の大きい血流と mAChR を部位別にみると、梗塞域の尾核線条体と頭頂葉は(図6)急性期に大きく減少したが mAChR は変化がなかった。慢性期では梗塞域の血流は壊死部にも少し認められたが、mAChR は境界明瞭にほとんど認められなくなった。視床では(図7)急性期に血流がやや減少したが mAChR は変化は

ほとんどなかった。慢性期では血流変化がなかったが mAChR はわずかに減少した。黒質では(図8)急性期に血流、mAChR とも変化はほとんどなかった。慢性期には血流が増加したが、mAChR はやや減少した。三叉神経運動核と中脳橋核では(図9)急性期に血流、mAChR とも変化がなかったが、慢性期には明かな血流変化がないが mAChR は減少した。

III. 脳血流分布

対照群、急性期群、慢性期群の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO を用いた脳血流分布における脳各部位の健側に対する患側の比を図10に示す。急性期群では患側対健側比が、広範に低下し、大脳皮質全体(図10, A, D, F, J)、尾状核線条体(図10, B)、側座核(図10, C)、海馬(図10, G)、扁桃体(図10, I)、上丘(図10, K)で有意に血流が減少した。ただし、黒質(図10, L)では有意に増加した。慢性期群では、全体に減少が回復し、側頭葉(図10, F)、側座核(図10, C)、海馬(図10, G)では減少は対照群に対して有意ではなかった。他の大脳皮質(図10, A, D, J)、尾状核線条体(図10, B)、扁桃体(図10, I)、上丘(図10, K)では減少が急性期群より軽度だが有意に低下した。黒質(図10, L)のみ急性期群よりさらに有意に増加した。三叉神経運動核(図10, M)、中脳橋核(図10, N)、小脳(図10, O)では有意な変化は両群に認めなかった。

IV. mAChR 分布

対照群、急性期群、慢性期群の ^3H -QNB を用いた mAChR 分布における脳各部位の健側に対する患側の比を図10に示す。急性期群では視床(図10, H)、扁桃体(図10, I)、三叉神経運動核(図10, M)で有意に患側対健側比が高くなった。大脳皮質(図10, A, D, F, J)、尾状核線条体(図10, B)、側座核(図10, C)、淡蒼球(図10, E)では軽度の比の低下傾向を認めたが有意ではなかった。慢性期群では広範な患側の受容体の減少があり、頭

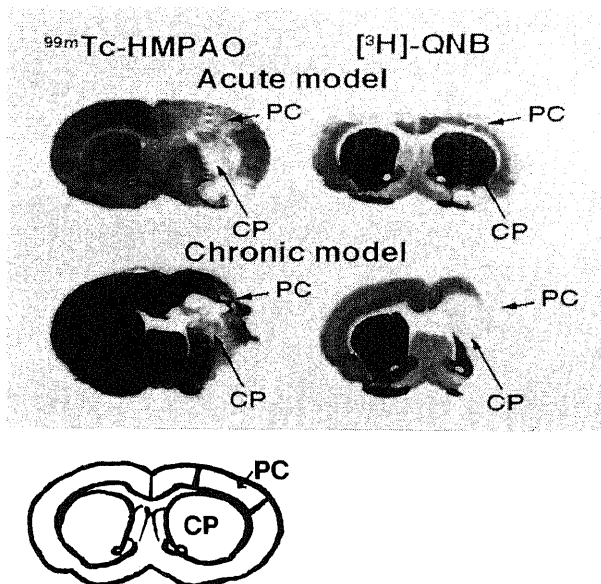


Fig. 6. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO (left) and ^3H -QNB (right) images of the same brain section of caudate-putamen (CP) in acute (upper) and chronic (lower) models. The rCBF of caudate-putamen and parietal cortex (PC) of the affected-side decreased in the acute model, but the mAChR of the same locations didn't change. The rCBF of the infarcted area is preserved a little in the chronic model, although the mAChR of the same locations scarcely detected.

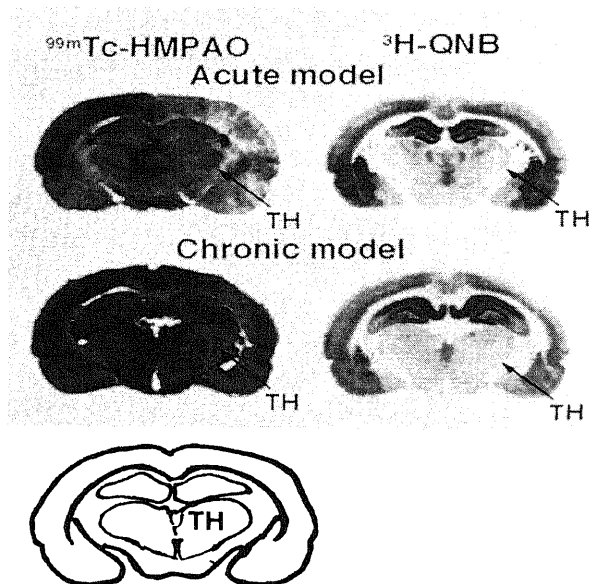


Fig. 7. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO (left) and ^3H -QNB (right) images of the same brain section of thalamus (TH) in an acute (upper) and a chronic (lower) models. The rCBF of thalamus of the affected-side slightly decreased in the acute model, but mAChR of the same location didn't change. The rCBF of thalamus of the affected-side showed no apparent changes in the chronic model, but the mAChR slightly decreased in the same location.

頂葉 (図10, D), 側頭葉 (図10, F), 尾状核線条体 (図10, B), 側座核 (図10, C), 視床 (図10, H), 黒質 (図10, L), 中脳橋核 (図10, N) で有意な比の低下を認めた。扁桃体 (図10, I) と三叉神経運動核 (図10, M) では対照群と有意差はなかった。ただし, 慢性期の三叉神経運動核の患側の受容体の減少が対照群と同程度あったためであった。

V. mAChR-mRNA 分布

対照群, 急性期群, 慢性期群の ^{35}S 標識オリゴヌクレオチドを用いた組織内ハイブリダイゼーションによる m1~m5 の mAChR-mRNA 分布における脳各部位の健側に対する患側の比を図10に示す。急性期群では, 梗塞域周囲大脳皮質の減少傾向があり, 前頭葉 (図10, A) で m2, 頭頂葉 (図10, D) で m3 に有意な低下を認めた。尾状核線条体 (図10, B) では, m2, m3, m4 で有意な減少を認めた。側座核 (図10, C) では, m1, m2, m4 で有意な低下を認めた。三叉神経運動核 (図10, M) にて対照群に比較して m2 で有意差を認めたが, これは ^3H -QNB 同様に対照群で手術側の mRNA が減少したためであった。他の部位では急性期群では有意な変化はなかった。慢性期群では, 患側の低下傾向がより明らかになった。前頭葉 (図10, A) で m2, 頭頂葉 (図10, D) で m1, m2, m3, m5 の有意な低下を認めた。尾状核線条体 (図10, B) では m1 から m5 の全てで有意な低下が認められた。側座核 (図10, C) では対照群に対する有意な低下はなかった。三叉神経運動核 (図10, M) では m2 でのみ有意な低下を認め, m1 でも低下傾向があった。海馬 (図10, G), 視床 (図10, H), 扁桃体 (図10, I), 後頭葉 (図10, J), 上丘 (図10, K), 黒質 (図10, L), 中脳橋核 (図10, N), 小脳 (図10, O) では有意な変化はなかった。

考 察

血流分布と受容体分布の関係は, 脳組織の一部に局限した研究は多いが, 体系的に捉えられたものは少ない。ムスカリン作動性アセチルコリン受容体に関しては, 全脳虚血による虚血部位の関連する変化については報告がある¹³⁾¹⁴⁾が, 局所虚血に関連した脳全体の分布変化については報告がない。mAChR-mRNA の局所脳虚血に関する報告は見当たらない。今回の研究では, 血流と mAChR および mAChR-mRNA の経時的変化を, 同一個体の脳連続切片にて3種類のオートラジオグラフィとコンピュータによるデジタル画像解析法にて解析して, 興味深い結果を得た。半定量化して解析したためわずかな変化も鋭敏に捉えられることができた。

Tamura らの手法による中大脳動脈閉塞ラット⁹⁾は, 局所脳梗塞モデル動物としては病変の出現が比較的均一であることやヒトの血管走行と類似していることなどから研究に適している¹⁵⁾。局所脳血流分布を調べるための血流用剤には, ^{14}C ヨードアンチピリン¹⁶⁾や N-インプロピル-p-[^{123}I] ヨードアンフェタミン¹⁷⁾などがあるが, 最近では臨床用 γ 線放出エネルギーが 140keV で撮像に適した $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO が頻用され, 痴呆症や神経精神疾患でも用いられるようになってきたので¹⁸⁾¹⁹⁾, 半減期が6.04時間と短く扱いも容易であることから今回の実験に用いた。しかし, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO が血中で代謝されたり血中蛋白と結合するため真の動脈入力濃度を測定し難いため局所脳血流を絶対定量することが困難なので²⁰⁾, 患側対健側の比をもって半定量的に解析した。今回の結果は, 急性期の血流分布は, 中大脳動脈領域の頭頂葉中心の大脳皮質と尾状核線条体で大きな

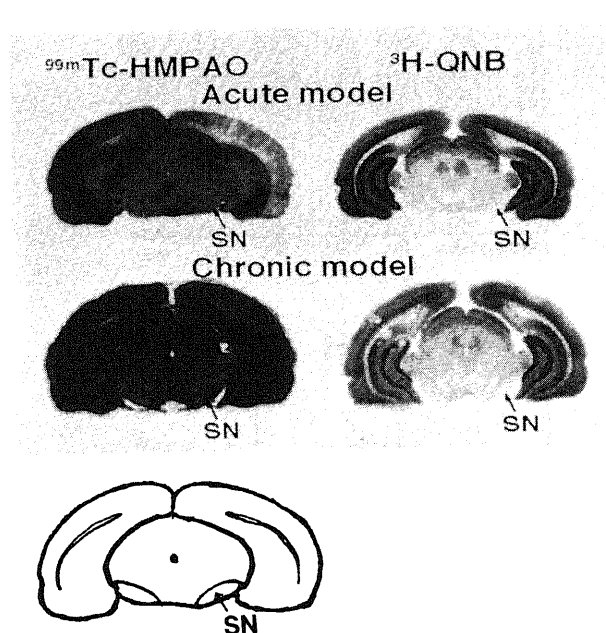


Fig. 8. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO (left) and ^3H -QNB (right) images of the same brain section of substantia nigra (SN) in an acute (upper) and a chronic (lower) models. The rCBF and the mAChR of substantia nigra of the affected-side showed little changes in the acute model. The rCBF of substantia nigra of the affected-side increased apparently in the chronic model, although the mAChR slightly decreased in the same location.

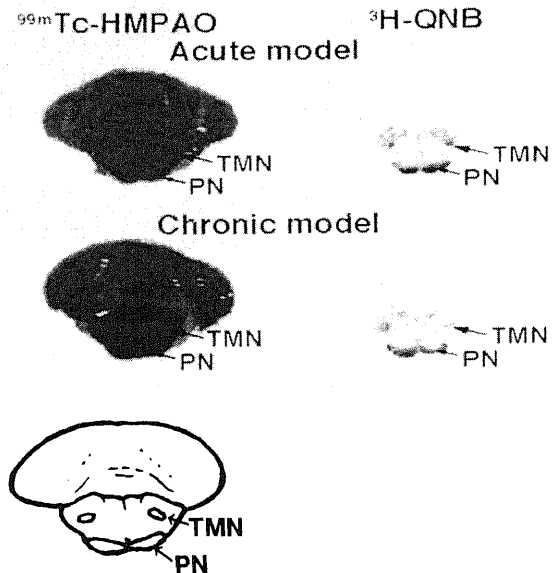


Fig. 9. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO (left) and ^3H -QNB (right) images of the same brain section of brain stem in an acute (upper) and a chronic (lower) models. The rCBF of trigeminal motor nucleus (TMN) of the affected-side showed no apparent changes in both acute and chronic models, but the mAChR of the same location decreased markedly in the chronic model. The pontine nucleus (PN) of the affected-side in the chronic model showed an apparent shrinkage, and the mAChR of pontine nucleus of the same location decreased slightly.

Affected to unaffected ratio

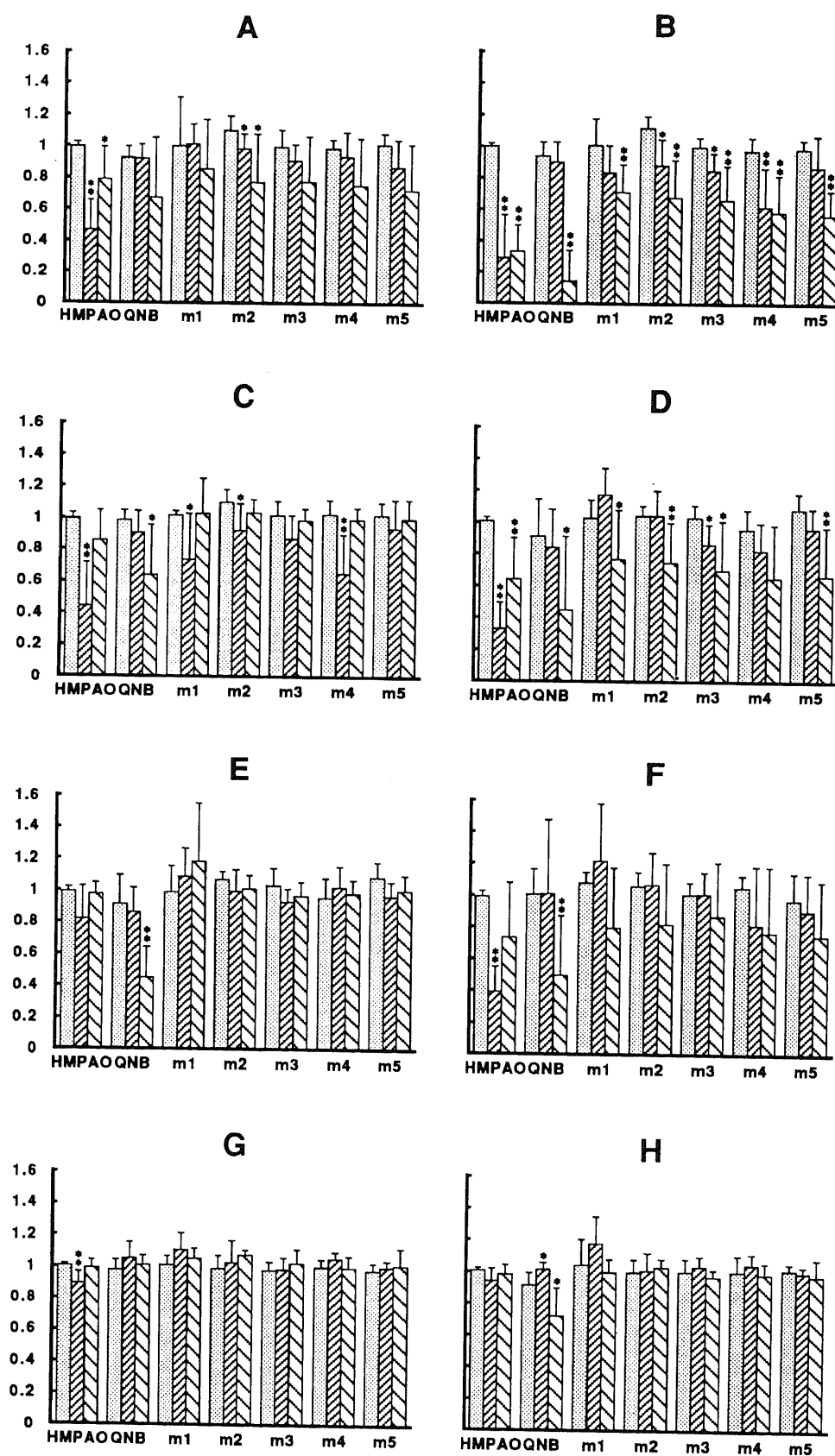


Fig. 10.

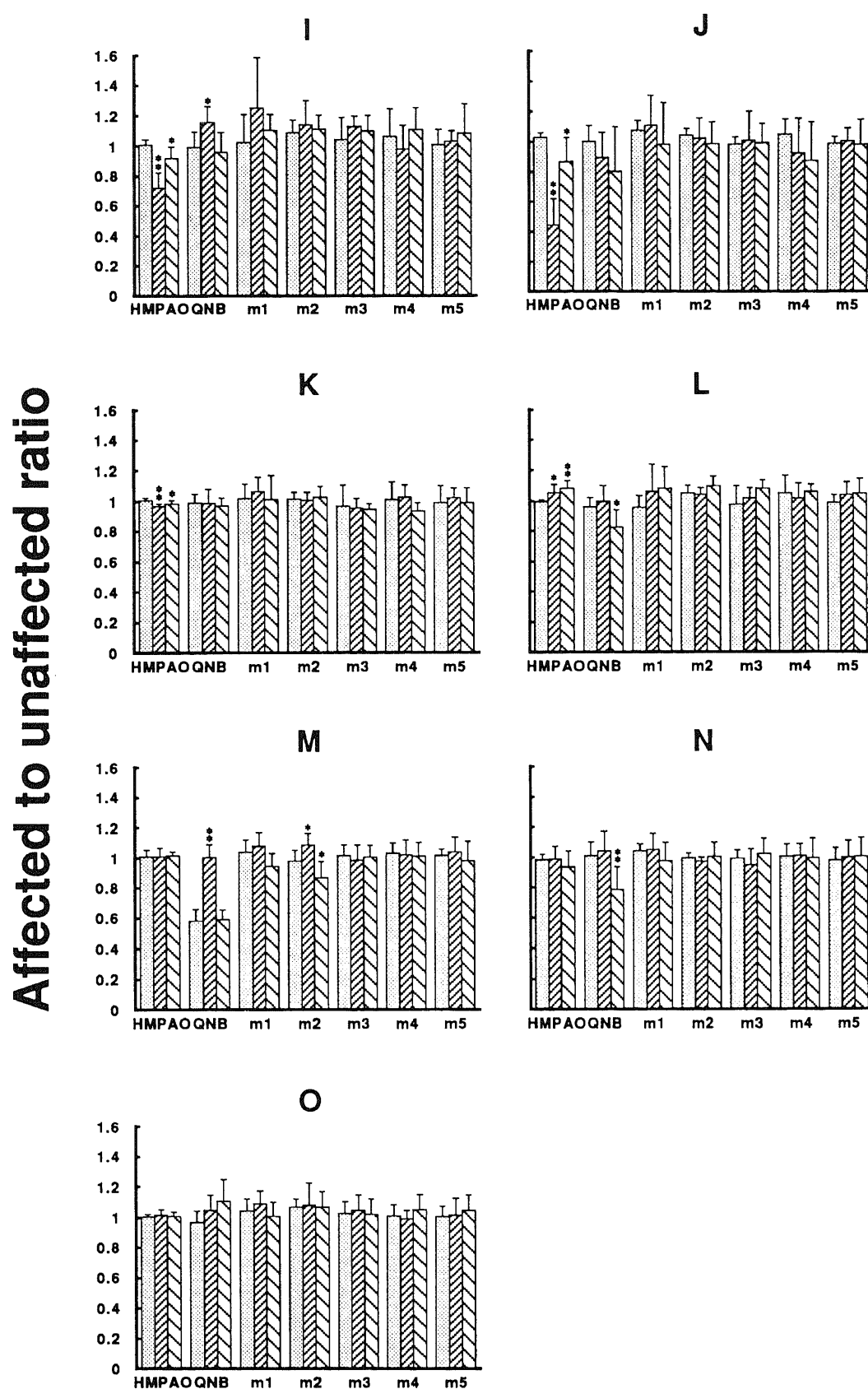


Fig. 10. Changes of affected-side to unaffected-side ratios (mean \pm standard deviation) of optical density of each locations using ^{99m}Tc -HMPAO (HMPAO), ^3H -QNB (QNB) and five kinds of mRNAs (m1~m5). A., frontal cortex; B., caudate-putamen; C., accumbens nucleus; D., parietal cortex; E., globus pallidus; F., temporal cortex; G., hippocampus; H., thalamus; I., amygdala; J., occipital cortex; K., superior colliculus; L., substantia nigra; M., trigeminal motor nucleus; N., pontine nucleus; O., cerebellum. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ compared to control sham-operated models. □, control sham-operated models; ▨, acute infarct models; ▩, chronic infarct models.

血流減少を認め、側座核や扁桃体など周辺領域でも有意な減少を認めた。一方、黒質では有意な血流増加を認めた。Tamuraらは、同じ急性期モデルラットで ^{14}C ヨードアンチピリンを用いた定量的オートラジオグラフィーにて同様の血流分布と梗塞側の黒質と淡蒼球の血流増加 (hyperemia) を報告している²¹⁾。今回淡蒼球の有意な増加は認めなかったが、大きな矛盾は認めず、解析法や手法が適当であったことが確認された。慢性期では全体に減少は軽減し、側座核や側頭葉では有意差は認めなかった。黒質では急性期よりもさらに血流増加が大きくなった。黒質では同モデル慢性期梗塞で神経脱落と膠細胞増生 (gliosis) が報告されており²²⁾、血流増加は膠細胞増生に伴う変化であると考えられた。

ムスカリン作動性アセチルコリン受容体の分布は、 ^3H -QNBの生体外結合反応を用いたので、血流の影響はほとんどないと考えられる。アンタゴニストである ^3H -QNBの特異的結合は約90%¹⁾であり、飽和条件で十分時間に反応させたので、非特異的結合の影響も少ないと考えられる。また、 ^3H -QNB結合反応は飽和する条件で行なったので、ムスカリン受容体数 ^3H -QNB濃度は比例すると考えられ、黒化度の比はムスカリン受容体数の比と考えられる。急性期の分布では、視床、扁桃体、三叉神経運動核で対照群と有意差を認めた。対照ラットの三叉神経運動核にて手術側のmAChRが減少していたが、対照ラットが手術をして2週間たっており、手術の際に三叉神経を損傷してしまうために、その核の三叉神経運動核では変性が起こったと考えられた。舌下神経や迷走神経で同様の軸索損傷に起因する神経核でのmAChRの減少が報告されており^{23)~25)}、慢性期群では対照群と三叉神経運動核で有意差がないことから理解できる。対照群の視床の減少は、この三叉神経の変化に関連している可能性がある。視床と扁桃体では一過性の軽度増加が認められ、経神経性の機能変化に関連した受容体数の増加である可能性が考えられた。虚血後に受容体が増加したとの報告もあり²⁶⁾、短時間で受容体合成を伴わない細胞膜を変化させる内在化 (internalization) のような受容体分布の変化がある可能性が示唆された²⁷⁾。慢性期では、中大脳動脈領域で直接虚血にさらされた頭頂葉、側頭葉、尾状核線条体にて大きな境界の明瞭なmAChRの低下を認めた。これは虚血による神経細胞死で説明される。すなわち血流がコリン作動性神経細胞の生命維持に必要な最低閾値血流量 (flow threshold) とされる約10ml/100g/min²⁸⁾²⁹⁾に満たない梗塞部位で神経脱落が起こったためと考えられる。側座核、視床、黒質、中脳橋核でも有意に低下が認められ、血流分布と相違が認められた。これは次のような経神経的遠隔効果と考えられた。慢性期モデルで梗塞側の視床および黒質の組織学的神経変性および萎縮が報告されており^{22)30)~32)}、Kataokaらは ^{14}C 2-デオキシグルコースを用いて梗塞側視床での代謝の低下と大脳皮質からの軸索輸送の低下から主に逆行性神経変性が起こったことによる変化であろうと結論している³³⁾。黒質の神経変性は尾状核被殻の梗塞による抑制性神経の脱落による経神経的変性であろうと考えられており³²⁾、抑制性線維の神経伝達物質であるガンマアミノ酪酸 (γ -aminobutylic acid, GABA) の尾状核線条体での減少³⁴⁾と黒質でのGABAの減少³⁵⁾が確認されている。側座核、視床、黒質、中脳橋核で同様の遠隔効果 (remote effect) が起こったためにmAChR分布変化が認められたと考えられる。ヒトで梗塞反対側の小脳や大脳の代謝と血流が低下することで知られる遠隔機能的抑制効果

(diaschisis)³⁶⁾と同じ機構に基づくものと考えられる。基底核レベルでの神経連絡についてはパーキンソン病や舞蹈病の関連でヒトについても詳しく調べられてきている³⁷⁾³⁸⁾が、ラットにおけるコリン作動性神経の機能関連が示された。ラットにおける梗塞側視床と黒質の神経変性は報告されていたが、mAChRの有意な低下を確認したのは今回が初めてである。一過性虚血後に海馬などで長期にわたってQNB結合が減少するような現象は報告されており³⁹⁾、遅発性神経壊死 (delayed neuronal death) と関連していると考えられる。 ^{125}I -イオマゼニールを用いて同ラットモデルでの梗塞側視床の中枢性ベンゾジアゼピン受容体の減少が示されており⁴⁰⁾、各種受容体でも変化が起こっていると思われる。慢性期モデルにて視床では血流は不変であり黒質では血流が増加していたので、mAChRの減少との相違は、神経変性によるコリン作動性神経の減少と随伴する膠細胞増生による血流増加を示していると考ええると矛盾しない。同モデルラットにて患側視床後外腹側核の経時的な体性感覚誘発電位測定にて、急性期で発火頻度が減少し梗塞後4~7日で一旦回復し、14日後には再び大きく減少したという報告があり⁴¹⁾、神経機能の変化が受容体変化と密接にかかわっていることが示唆される。側座核や中脳橋核でも同様の神経変性が起こっていると思われる。

^{35}S 標識オリゴヌクレチオドプローブを用いた組織内ハイブリダイゼーションは、発現しているmRNAに対する一部配列の相補的なオリゴヌクレチオドを合成し ^{35}S 標識して組織切片内にてmRNAと特異的に結合させる手法である。標的mRNAに対して最適な配列のオリゴヌクレチオドを設計し合成することにより任意のmRNAを高感度に検出できて汎用的である。最近では蛍光物質を標識する蛍光組織内ハイブリダイゼーション (fluorescent in situ hybridization, FISH) が用いられるようになってきた⁴²⁾が、オリゴヌクレチオドは標識物質を1分子中に多く結合させられないため感度の高い放射性標識の方が適している。標識核種には、他に ^{32}P 、 ^3H 等がある。 ^{32}P は半減期が14.26日と短いため比放射能は高くでき露光は早いが出 β 線のエネルギーが1.71MeVと高いために飛程が大きくなり画像の分解能が悪くなる。逆に ^3H では放出 β 線のエネルギーが0.0186MeVと低いため分解能は非常に高いが半減期が12.3年と長いので比放射能を低くせざるをえないため露光時間が長くなり、専用のフィルムが必要となる。 ^{35}S は放出 β 線のエネルギーが0.167MeV、半減期が87.5日であり両者の中間にあたる。実験終了後の最近になって、放出 β 線のエネルギーが0.27MeVで比放射能が高く、半減期は25.4日で分解能も高い ^{35}P という核種が使用可能となった。今回使用したムスカリン受容体mRNAに対するプローブはすでに特異性の高いことが確認された配列の市販品を使用した。今回は通常のX線フィルムを用いたため感光に長期間を要したが、高感度フィルムを用いれば感光時間は半分以下に短縮できる。今回用いたmlからm5までのmRNAの分布はそれぞれ異なり、対照群では過去の報告と一致した分布を示した⁴³⁾。今回の定量化では、シグナルのばらつきが大きく黒化度が少ないため有意差は出にくかったと考えられる。急性期群で虚血部位の尾状核線条体の減少と大脳皮質の減少傾向があり、側座核での減少も認められた。受容体では有意な減少が認められなかった点と対照的であり、虚血に陥り早期からmRNAの減少があることが確認された。これは、細胞内でのmRNA合成が停止した後でmAChR

が減少することを示している。細胞膜が維持されてまだ生存する細胞だがエネルギーが不十分のために mRNA 合成を停止した、すなわち、生きてはいるが機能を停止したコリン作動性神経が存在する可能性がある。慢性期群では梗塞部の大脳皮質と尾状核線条体の mAChR-mRNA の低下が著しく、他部位の低下は有意ではなくなった。遠隔効果は特に有意に現われなかった。三叉神経運動核では急性期群では左右差がなかったものが、対照群と慢性期群で梗塞側の減少を認めた。三叉神経運動核には、m2 以外はあまり結合せず、結合の多い m2 で、mAChR と同様に三叉神経末梢の神経侵襲の結果の神経変性に伴う現象が認められたと考えられた。m1 でも低下傾向があった。mRNA 分布は、虚血に対して変化が早いものの、シグナルが弱いためあまり小さな変化は捉えられないことがわかった。mAChR のサブクラスによる相違は、それぞれが発現している神経の分布や調節の違いから生じている可能性もある⁴⁰⁻⁴⁶。

以上、血流、mAChR、mAChR-mRNA の虚血に対する経時変化から差違が認められたことから得られた知見は次のようになる。大脳皮質頭頂葉や尾状核線条体等の虚血部位では血流は急性期に高度に減少するが、慢性期には少し回復する。mAChR は急性期ではほとんど変化がないが、慢性期では大きく減少する。mAChR-mRNA は急性期から低下があり、慢性期ではさらに減少する。最低閾値血流量以上の血流が保たれた梗塞周辺部では、急性期では血流が低下するが、慢性期では回復する。mAChR は、慢性期でやや減少するが、mAChR-mRNA は変化が乏しい。梗塞部位と神経連絡上密接な関係のある視床や黒質等の部位では複雑な変化がある。急性期では梗塞部に近い視床や淡蒼球では血流が低下傾向を見せるが、mAChR や mAChR-mRNA は変化はなくむしろやや増加している。慢性期では、mAChR は神経変性に伴ない減少するが、血流は膠細胞増生に伴う血流増加の影響で視床では有意変化はなく、黒質ではむしろ増加する。mAChR-mRNA の変化は乏しい。また、三叉神経運動核はモデル作成時に三叉神経に強い侵襲を加えるために変性し、慢性期で mAChR と m2-mAChR-mRNA の有意な減少を認めた。血流は有意な変化はなく、中大脳動脈を閉塞する必要が無い上に三叉神経を切るなど侵襲を加える手技は簡単であるからコリン作動性神経変性を観察する良いモデルと考えられた。

mAChR 分布はコリン作動性神経細胞の細胞膜が維持されている状態を示すと思われ、周囲の膠細胞等には分布しないと考えられる。血流変化が脳に広範に及んだのと同様に mAChR 分布も広範に変化が及んだが血流変化とは異なる変化を認めた事実から血流ではなく脳組織内に生存するコリン作動性神経細胞の密度に相関していると推察された。mAChR-mRNA 分布は細胞の受容体合成の状態を示すものであり、mAChR 分布と比較することにより、神経細胞の代謝情報を得られる。尾状核線条体では梗塞急性期に、細胞膜は維持されて生きてはいるが mRNA 合成は停止したような機能低下コリン作動性神経の存在が示唆された。また、血流分布は、あくまで脳組織全体での活性を示すもので、神経細胞の活性のみならず膠細胞など周囲細胞の活性も合わせて示すことが今回の諸実験で確認された。陽電子放射断層撮影 (positron emission computed tomography, PET) にて、急性脳虚血発作にて徐々に神経壊死が進行していくことがヒトでも観察されており⁴⁷、急性脳梗塞の早期治療な

ども行なわれるようになってきている。痴呆症では血流分布の異常が多く認められるが⁴⁸、神経細胞がどの時期からどの部位でどの程度に変性しているのかを知るには、種々の受容体画像にて判断する必要がある。血管性痴呆の場合、もし小さな梗塞がゆくりと多発しているとすれば、初期では膠細胞増生のために血流の減少が目立たずに、神経細胞の変性が進行しているということも十分に推測される。そのような例では受容体画像は早期痴呆の発見に役立つであろう。ただし、変化は早期では少なく、漸進性であることも予想されるので、単一光子放射断層撮影 (single photon emission computed tomography, SPECT) による局所的なより精度の高い定量法を確立する必要があると思われる。また、血流情報を示標として相対的に局所分布の差違を検出することが有用であることが、今回の結果からも明らかである。今回の結果から、受容体分布の経時変化と遠隔効果および血流分布との相違についてその実際の変化と機構がかなり理解されたと思われる。

結 論

中大脳動脈閉塞脳梗塞モデルラットおよび対照ラットにおいて ^{99m}Tc-HMPAO 脳血流分布、連続脳切片の ³H-QNB 生体外結合法による mAChR 分布、および ³⁵S 標識オリゴヌクレオチドプローブを用いた組織内ハイブリダイゼーションによって得た mAChR の mRNA 分布を得て画像解析し、同一個体にて血流、受容体、受容体 mRNA の 3 種の分布変化を比較検討することにより以下の知見を得た。

1. 急性期において血流が低下した大脳皮質や尾状核線条体では特に mAChR の低下は認めなかったが、患側の視床と扁桃体においてはむしろ一時的に mAChR の増加を認めた後で減少した。mAChR は大脳皮質や尾状核線条体の梗塞部位でも急性期では変化はほとんどなく、慢性期になると大きく減少することがわかった。

2. 急性期における mAChR-mRNA は、血流の低下した尾状核線条体では低下傾向を認めたが大脳皮質では変化が乏しかった。尾状核線条体での mAChR と mAChR-mRNA 分布の解離は、虚血下で生きてはいるが mAChR の合成が停止した機能低下神経細胞の存在を示していると考えられた。

3. 慢性期では患側淡蒼球、視床、黒質、中脳橋核での mAChR 低下も認めたが、血流は淡蒼球、視床、中脳橋核では変化がなく、黒質ではむしろ増加した。これは、虚血がなく二次的に神経変性した部位では gliosis に伴う血流増加があるためと推測された。

4. 慢性期においては mAChR、mAChR-mRNA は梗塞に至った尾状核線条体と大脳皮質にて境界の明瞭な減少を認め、mAChR と mAChR-mRNA の分布は皮質と尾状核線条体の梗塞部ではほぼ一致した。これは神経細胞の flow threshold 以下の血流域で神経細胞が死滅したためと考えられた。

5. 局所脳虚血に伴う mAChR 分布の変化は脳全体におよび血流変化よりもむしろ神経細胞の密度変化による影響が大きかった。

6. 三叉神経運動核での mAChR と m2 mAChR-mRNA の分布変化は、三叉神経末梢の侵襲による変化であったが、神経変性によるコリン作動性神経細胞の変化を知るためのよいモデル部位と考えられた。

7. mAChR 分布は生存するコリン作動性神経細胞の密度を

示し, mAChR-mRNA 分布は細胞の受容体合成の状態を示すと考えられるので, 両者を比較することにより神経細胞の代謝情報を得られると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み, 御指導, 御校閲を賜りました恩師久田欣一教授に深甚なる謝意を表します。また, 本研究の遂行にあたり御指導, 御協力を頂いた国立精神神経センター武蔵病院放射線診療部長松田博史博士, 金沢大学アイソトープセンター森 厚文教授, 同柴和弘助手, 金沢大学核医学教室脳グループの隅屋 寿助手, 辻 志郎助手その他教室員各位に深く感謝致します。

なお本論文の要旨は, 第32回日本核医学会総会(1992年横浜)および第33回日本核医学会総会(1993年宮崎)において発表した。

本研究の一部は文部省科学研究費(一般研究 B: 課題番号 03454280)によったことに謝意を表する。

文 献

- 1) 三好理恵: ムスカリン性アセチルコリン・レセプター, 新脳のレセプター(小川紀雄編), 第1版, 131-148 頁, 世界保健通信社, 大阪, 1991.
- 2) Kubo, T., Fukuda, K., Mikami, A., Maeda, A., Takahashi, H., Mishina, M., Haga, T., Haga, K., Ichiyama, A., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T. & Numa, S.: Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, 323, 411-416 (1986).
- 3) Braun, T., Schofield, P. R., Shivers, B. D., Pritchett, D. B. & Seeburg, P. H.: A novel subtypes of muscarinic receptor identified by homology screening. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149, 125-132 (1987).
- 4) Vilaro, M. T., Palacios, J. M. & Mengod, G.: Localization of m5 muscarinic receptor mRNA in rat brain examined by in situ hybridization histochemistry. *Neurosci. Lett.*, 114, 154-159 (1990).
- 5) Perry, E. K., Perry, R. H., Blessed, G. & Tomlinson, B. E.: Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet*, 1, 189 (1977).
- 6) Hardy, J., Adolfsson, R., Alafuzoff, I., Bucht, G., Marcusson, J., Nyberg, P., Perdahl, E., Wester, P. & Winblad, B.: Transmitter deficits in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.*, 7, 545-563 (1985).
- 7) Nitsch, R. M., Slack, B. E., Wurtman, R. J. & Growdon, J. H.: Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science*, 258, 304-307 (1992).
- 8) Gall, J. G. & Pardue, M. L.: Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 63, 378-383 (1969).
- 9) Tamura, A., Graham, D. I., McCulloch, J. & Teasdale, G. M.: Focal cerebral ischemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1, 53-60 (1981).
- 10) Lear, J. L.: Quantitative local cerebral blood flow measurements with technetium-99m HM-PAO: evaluation using multiple radionuclide digital quantitative autoradiography. *J. Nucl. Med.*, 29, 1387-1392 (1988).
- 11) Matsuda, H., Tsuji, S., Oda, H., Imai, K., Shiba, K., Terada, H., Seki, H., Sumiya, H., Mori, H. & Hisada, K.: Direct autoradiographic comparison of ^{99m}Tc -HMPAO with ^{125}I -IMP in experimental brain ischaemia. *Nucl. Med. Commun.*, 9, 891-897 (1988).
- 12) Paxinos, G. & Watson, C.: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed., p28-159, Academic press Inc., San Diego, 1986.
- 13) Araki, T., Kato, H., Kogure, K. & Saito, T.: Postischemic alteration of muscarinic acetylcholine, adenosine A1 and calcium antagonist binding sites in selectively vulnerable areas: an autoradiographic study of gerbil brain. *J. Neurol. Sci.*, 106, 206-212 (1991).
- 14) Onodera, H., Sato, G. & Kogure, K.: Quantitative autoradiographic analysis of muscarinic cholinergic and adenosine A1 binding sites after transient forebrain ischemia in the gerbil. *Brain Res.*, 415, 309-322 (1987).
- 15) 佐野圭司, 田村 晃, 早川 徹, 桐野高明: 脳卒中実験ハンドブック, 第1版, 86-97 頁, アイピーシー社, 東京, 1992.
- 16) Sakurada, O., Kennedy, C., Jehle, J., Brown, J. D., Carbin, G. L. & Sokoloff, L.: Measurement of local cerebral blood flow with iodo[^{14}C]antipyrine. *Am. J. Physiol.*, 243, H59-H66 (1978).
- 17) Winchell, H. S., Horst, W. D., Braun, L., Oldendorf, R. & Parker, H.: N-isopropyl-[^{125}I] p-iodoamphetamine: single-pass brain uptake and washout; binding to brain synaptosomes; and localization in dog and monkey brain. *J. Nucl. Med.*, 21, 947-952 (1980).
- 18) Costa, D. C., Ell, P. J., Burns, A., Philpot, M. & Levy, R.: CBF tomograms with [^{99m}Tc]-HMPAO in patients with dementia (Alzheimer type and HIV) and Parkinson's disease - initial results. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 8, S109-S115 (1988).
- 19) Smith, F. W., Besson, J. A. O., Gemmell, H. G. & Sharp, P. F.: The use of Technetium-99m-HM-PAO in the assessment of patients with dementia and other neuropsychiatric conditions. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 8, S116-S122 (1988).
- 20) Andersen, A. R., Friberg, H., Lassen, N. A., Kristensen, K. & Neirinx, R. D.: Assessment of the arterial input curve for [^{99m}Tc]-d, l-HMPAO by rapid octanol extraction. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 8, S23-S30 (1988).
- 21) Tamura, A., Graham, D. I., McCulloch, J. & Teasdale, G. M.: Focal cerebral ischemia in the rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by [^{14}C] iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1, 53-60 (1981).
- 22) Tamura, A., Kirino, T., Sano, K., Takagi, K. & Oka, H.: Atrophy of ipsilateral substantia nigra following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res.*, 510, 154-157 (1990).
- 23) Rotter, A., Birdsall, N. J. M., Burgen, A. S. V., Field, P. M. & Raisman, G.: Axotomy causes loss of

muscarinic receptors and loss of synaptic contacts in the hypoglossal nucleus. *Nature*, 266, 734-735 (1977).

- 24) Rotter, A., Birdsall, N. J. M., Burgen, P. M., Field, P. M., Smolen, A. & Raisman, G.: Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. IV. A comparison of the effects of axotomy and deafferentiation on the binding of [³H]propylbenzilycholine mustard and associated synaptic changes in the hypoglossal and pontine nuclei. *Brain Res. Rev.*, 1, 207-224 (1979).
- 25) Hoover, D. B., Hancock, J. C. & DePorter, T. E.: Effect of vagotomy on cholinergic parameters in nuclei of rat medulla oblongata. *Brain Res. Bull.*, 15, 5-11 (1985).
- 26) 須貝勝平: ラットの脳内コリン作動性神経系に対する虚血および虚血後血行再開の影響. *麻酔*, 38, 350-356 (1984).
- 27) Liles, W. C., Hunter, D. D., Meier, K. E. & Nathanson, N. M.: Activation of protein kinase C induces rapid internalization and subsequent degradation of muscarinic acetylcholine receptors in neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.*, 261, 5307-5313 (1986).
- 28) Heiss, W.: Flow thresholds of functional and morphological damage of brain tissue. *Stroke*, 14, 329-331 (1983).
- 29) Xie, Y., Mies, G. & Hossmann, K. A.: Ischemic threshold of brain protein synthesis after unilateral carotid artery occlusion in gerbils. *Stroke*, 20, 620-626 (1989).
- 30) Fujie, W., Kirino, T., Tomukai, N., Iwasawa, T. & Tamura, A.: Progressive shrinkage of the thalamus following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 21, 1485-1488 (1990).
- 31) Iizuka, H., Sakatani, K. & Young, W.: Neural damage in the rat thalamus after cortical infarcts. *Stroke*, 21, 790-794 (1990).
- 32) 田村 晃, 桐野高明, 戸向則子, 岩沢智美, 高木 清, 中山比登志, 岡 秀宗, 佐野圭司: ラット中大脳動脈閉塞後の同側黒質の組織学的変化. *医学のあゆみ*, 149, 789-790 (1989).
- 33) Kataoka, K., Hayakawa, T., Yamada, K., Mushiroi, T., Kuroda, R. & Mogami, H.: Neuronal network disturbance after focal ischemia in rats. *Stroke*, 20, 1226-1235 (1989).
- 34) Francis, A. & Pulsinelli, W.: Increased binding of [³H]GABA to striatal membranes following ischemia. *J. Neurochem.*, 40, 1497-1499 (1983).
- 35) 中山比登志: ラット中大脳動脈閉塞後の大脳基底核アミノ酸神経伝達物質の経時的変動. *脳と神経*, 38, 1043-1050 (1986).
- 36) Hoedt-Rasmussen, K. & Skinhoj, E.: Transneuronal depression of the cerebral hemispheric metabolism in man. *Acta Neurol. Scand.*, 40, 41-46 (1964).
- 37) Albin, R. L.: The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.*, 12, 366-375 (1989).
- 38) Alexander, G. E. & Crutcher, M. D.: Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.*, 13, 266-271 (1990).
- 39) Araki, T., Kato, H., Kogure, K. & Kanai, Y.: Long-term changes in gerbil brain neurotransmitter receptors following transient cerebral ischaemia. *Br. J. Pharmacol.*, 107, 437-442 (1992).
- 40) 松田博史, 辻 志郎, 久慈一英, 久田欣一: 実験的慢性脳梗塞における中枢性ベンゾジアゼピン受容体と脳血流. *核医学*, 30, 643-650 (1993).
- 41) Tokuno, T., Kataoka, K., Asai, T., Chichibu, S., Kuroda, R., Ioku, M., Yamada, K. & Hayakawa, T.: Functional changes in thalamic relay neurons after focal cerebral infarct: a study of unit recordings from VPL neurons after MCA occlusion in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 12, 954-961 (1992).
- 42) 堀 雅明, 中村祐輔: ラボマニユアルヒトゲノムマッピング. 第1版, 101-133 頁, 丸善, 東京, 1991.
- 43) Buckley, N. J., Bonner, T. I. & Brann, M. R.: Localization of a family of muscarinic receptor mRNA in rat brain. *J. Neurosci.*, 8, 4646-4652 (1988).
- 44) Brann, M. R., Buckley, N. J. & Bonner, T. I.: The striatum and cerebral cortex express different muscarinic receptor mRNAs. *FEBS Lett.*, 230, 90-94 (1988).
- 45) Fukamachi, F., Hough, C. & Chuang, D. M.: Expression and agonist-induced down-regulation of mRNAs of m2- and m3-muscarinic acetylcholine receptors in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.*, 56, 716-719 (1991).
- 46) Habecker, B. A. & Nathanson, N. M.: Regulation of muscarinic acetylcholine receptor mRNA expression by activation of homologous and heterologous receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89, 5035-5038 (1992).
- 47) Heiss, W., Huber, M., Flink, G. R., Herholz, K., Pietrzyk, U., Wagner, R. & Wienhard, K.: Progressive derangement of periinfarct viable tissue in ischemic stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 12, 193-203 (1992).

Studies for Transitional Changes of the Muscarinic Acetylcholine Receptor and mRNA Distribution by Focal Ischemia Using Nuclear Medicine Ichiei Kuji, Department of Nuclear Medicine, School of medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med Soc., 103, 252—264 (1994)

Key words muscarinic acetylcholine receptor, middle cerebral artery occlusion, in situ hybridization, muscarinic receptor mRNA, cerebral blood flow

Abstract

Brain receptor responses induced by stress are important factors in evaluating physiological autoregulation and pathological states of the brain, especially in understanding clinical brain receptor images for nuclear medicine. Cholinergic neurons are known to be decreased by Alzheimer's disease, and are thought to have a close relation to memory. Cholinergic neurons and muscarinic acetylcholine receptors (mAChR) have a close relation. So mAChRs seem to play some role in dementia states. Many research studies about changes of focal mAChR distribution by ischemia are reported, but few about changes of global mAChR distribution after focal cerebral infarction. We used infarction model rats by middle cerebral artery occlusion method and sham-operated rats for evaluating the response of mAChR to focal ischemia. In the same rat, three kinds of images were obtained in an acute phase and in a chronic phase. Firstly, ex vivo regional cerebral blood flow (rCBF) imaging using ^{99m}Tc -hexamethyl-propyleneamine oxime (^{99m}Tc -HMPAO) was done. Secondly in vitro mAChR binding imaging using [^3H] quinuclidinyl benzilate (^3H -QNB) was done. Thirdly mAChR-mRNA imaging by in situ hybridization method using ^{35}S -labeled-oligonucleotide probes specific for mAChR gene subtypes of m1 to m5 was done. Each image datum was digitalized and assessed semi-quantitatively. Significant discrepancies in global distributional changes were observed between rCBF, mAChR and mAChR-mRNAs. In the acute phase, mAChR in the infarcted area didn't change significantly, although the rCBF decreased markedly. In the chronic phase, mAChR in the infarct-sided thalamus decreased significantly, although the rCBF didn't change. In the chronic phase, mAChR of the infarct-sided substantia nigra significantly decreased, despite the rCBF increasing. In the acute phase, mACh-mRNAs of the infarct-sided caudate-putamen decreased, so it is suggested that the ability of cholinergic neuron to synthesize receptor protein had already been depressed in the acute phase. The mAChR in the acute phase didn't apparently decrease, so it is thought that some viable neuron without normal neural functions may be preserved in the acute phase. In particular, the mAChR distribution is shown to be a valuable marker for neuronal functions such as viability of cholinergic neurons and remote effects by focal ischemia. By evaluating distributional changes of rCBF, mAChR and mAChR-mRNAs semi-quantitatively in the same model rat brain, new results were obtained about the relationships between rCBF, mAChR and mAChR-mRNAs distributions. These results must contribute to understanding mAChR brain images of patients with memory disturbances such as cerebrovascular dementia and Alzheimer's disease.